

Aus der physiologisch-chemischen Anstalt der Universität Basel
Vorsteher Prof. Dr. phil. Karl Bernhard (unter Leitung von P. D. Dr. Oswald Wiß)

Über die Beeinflussung des Tyrosin- und Leucingehaltes in Harn und Blut durch Phosphorvergiftung bei der Ratte

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde der Medizinischen
Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

PAUL ELSENER

Baar (Kt. Zug)

Basel

~~LUZERN~~ 1953 — BUCHDRUCKEREI OTTO VONWYL & CO

4

Aus der physiologisch-chemischen Anstalt der Universität Basel
Vorsteher Prof. Dr. phil. Karl Bernhard (unter Leitung von P. D. Dr. Oswald Wiß)

Über die Beeinflussung des Tyrosin-
und Leucingehaltes in Harn und Blut durch
Phosphorvergiftung bei der Ratte

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde der Medizinischen
Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

PAUL ELSENER

Baar (Kt. Zug)

Von der medizinischen Fakultät genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. phil. Karl Bernhard



Tag der Promotion 9. November 1951

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung	5
Experimenteller Teil	
I. Allgemeines zur mikrobiologischen Aminosäurebestimmung . .	7
II. Mikrobiologische Methode zur quantitativen Bestimmung von Tyrosin und Leucin in Körperflüssigkeiten mit <i>Leuconostoc</i> mesenteroides P-60 (8042)	7
III. Erzeugung von Leberschäden durch Phosphorinjektion . . .	12
IV. Leucin- und Tyrosinausscheidung normaler Ratten	12
V. Leucin- und Tyrosinausscheidung nach einmaliger subcutaner Injektion von Phosphor	16
VI. Leucin- und Tyrosinausscheidung nach wiederholter subcutaner Phosphorinjektion	22
VII. Leucin- und Tyrosingehalt im Serum normaler Ratten . . .	32
VIII. Leucin- und Tyrosingehalt im Rattenserum nach Phosphorinjektion	34
Diskussion der Ergebnisse	38
Zusammenfassung	39
Literaturangaben	40
Curriculum vitae	41



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548223_0075

Einleitung

E. Abderhalden und *P. Bergell* (1) und *E. Abderhalden* und *L. F. Backer* (2) untersuchten Harn auf den Gehalt an Aminosäuren mit der -Naphtalin-sulforeaktion. Es gelang ihnen, mit dieser Methode selbst geringe Mengen von Aminosäuren nachzuweisen. Die Methode eignet sich jedoch nur zur Bestimmung des Gesamtgehaltes der Aminosäuren; einzelne Aminosäuren lassen sich mit dieser Methode nicht ermitteln. Mit Hilfe der Veresterungsmethode nach *Fischer* vermochten sie Leucin im Harn von mit Phosphor vergifteten Hunden direkt nachzuweisen. *E. Abderhalden* und *Schittenhelm* (3) wiesen darauf hin, daß das Auftreten von freien Aminosäuren im Harn als Zeichen einer Störung im normalen Ablauf des intermediären Eiweiß-Stoffwechsels galt. Nach der Methode von *E. Fischer* und *P. Bergell* ist es ihnen jedoch gelungen, solche im normalen Harn nachzuweisen. Ihre Beobachtungen ließen sie darauf schließen, daß auch unter normalen Umständen in geringer Menge Aminosäuren in freiem Zustand im Urin auftreten können. *Fr. Samuely* und *G. Forssner* (4) haben sich ebenfalls nach der Methode von *Fischer* und *Bergell* bemüht, die freien Aminosäuren im Harn zu ermitteln. Sie konnten auch keine sicheren Angaben machen, halten es jedoch für wahrscheinlich, daß freie Aminosäuren im Harn auftreten können. *Fischer* und *H. Stroller* (5) hielten das Vorkommen von Leucin und Tyrosin im normalen Harn für ausgeschlossen. Sie waren der Ansicht, daß ihr Vorkommen auf erhebliche Stoffwechselstörungen hinweise. *Erwin Risak* (6) glaubte, daß das Vorkommen von Leucin und Tyrosin zur Annahme von autolytischen Zerfallsprozessen berechtigt.

Nach Phosphor-Vergiftung, die *Humber* (7) als experimentelle gelbe Leberatrophie bezeichnet, stellten *J. Bang* (8), *A. Fränkel* (9) und *J. Feigel* und *H. Luce* (10) eine quantitative Erhöhung der Aminosäureausscheidung fest. *T. Araki* (11) vergiftete Kaninchen mit der Methode von *H. Meyer*, indem er den Versuchstieren in Olivenöl aufgelöstes Phosphor unter die Haut spritzte.

Die Sektion der Tiere ergab eine deutliche Verfettung der Leber sowie der Milz und der Nieren. Er konnte jedoch nach der Phosphor-Vergiftung nie Leucin oder Tyrosin feststellen.

O. Schumm und Papendick (12) untersuchten den Harn einiger Dutzend Leberkranken nach der Kristallisationsmethode von *Frerich* und *Städeler* auf Tyrosin. Es gelang ihnen jedoch nur in den wenigsten Fällen, das Tyrosin mit Sicherheit zu bestimmen. Bei mehreren Untersuchungen im normalen Harn konnten sie in keinem Fall Tyrosin nachweisen. F. Goebel (13) bemerkt zur Kristallisationsmethode, daß die Diagnose auf Tyrosin und Leucin bei kleinen Mengen aus den Kristallen allein zu stellen oft irreführend sei. Die Stoffe müßten schon isoliert oder der Aminosäurestickstoff bestimmt werden. F. Falk und P. Saxel (14) und W. Frey (15) beobachteten bei Leberkranken eine gesteigerte Aminosäureausscheidung. Ähnliche Beobachtungen machten auch M. Labbé und H. Nith (16). A. E. Taylor (17) gelang es, in einem Falle von gelber Leberatrophie in der Leber, welche er 6 Stunden post mortem extirpierte, nach der Methode von *Fischer* Leucin mit Sicherheit nachzuweisen.

Abderhalden (18) untersuchte das Blut auf seinen Aminosäuregehalt, nachdem er diesen durch Dialyse vom Eiweiß getrennt hatte. Er wies die einzelnen Aminosäuren durch Isolierung oder durch fraktionierte Destillation ihrer Ester nach. Es gelang so nachzuweisen, daß alle als Eiweißbausteine bekannten Aminosäuren in freier Form im Blutplasma vorhanden sind. Die angewandte Methode gestattete jedoch nicht, die einzelnen Aminosäuren quantitativ zu bestimmen.

Neuere Methoden ermöglichen es, den Gehalt einzelner Aminosäuren in Körperflüssigkeiten zu bestimmen, auch wenn diese in kleiner Konzentration vorliegen. So lassen sich z. B. in Blut (19) und Harn (20) auf mikrobiologischem Wege die freien Aminosäuren ermitteln, auch wenn nur kleine Mengen des zu untersuchenden Materials zur Verfügung stehen.

Mit den folgenden Untersuchungen wurde festgestellt, wie der Gehalt und die Ausscheidung von Tyrosin und Leucin in Blut und Harn sich bei der Ratte durch Phosphorvergiftung beeinflussen lassen.

Die beiden Aminosäuren wurden mikrobiologisch nach der Methode von *Dunn* und Mitarbeitern (21) bestimmt.

Experimenteller Teil

I. Allgemeines zur mikrobiologischen Aminosäurebestimmung

Das Prinzip der mikrobiologischen Methode zur Bestimmung von Aminosäuren beruht darauf, daß die zu bestimmende Aminosäure für das Wachstum des verwendeten Bakterienstammes (*Lactobacillus*) unentbehrlich ist. Man stellt eine Nährlösung her, die alle Substanzen, mit Ausnahme der zu bestimmenden, in einer für das Wachstum der Bakterien optimalen Konzentration enthält. Durch Zusatz von bekannten, abgestuften Mengen der zu bestimmenden Aminosäure zur Nährlösung erhält man sogenannte Standardansätze, die ein Wachstum der Bakterien nur in ganz bestimmtem Umfang gestatten. Als Maß des Wachstums dient die während der Bebrütungszeit gebildete Milchsäure, die sich sehr leicht titrimetrisch bestimmen läßt. Die Auswertung der Versuchsansätze erfolgt nach der so erhaltenen Standardkurve, die für jeden Versuch neu ermittelt werden muß.

II. Mikrobiologische Methode zur quantitativen Bestimmung von Tyrosin und Leucin in Körperflüssigkeiten mit *Leucostoc mesenteroides* P-60 (8042)

Dauerkultur auf Schrägagar:

Die Dauerkultur besteht aus: 1 ‰ Glucose
1 ‰ Difco-Hefeextrakt
1,5 ‰ Agar

Die Substanzen werden in einem Rundkölbchen gelöst und 15 Minuten bei 115 °C sterilisiert. Nach 3—4 Tagen wird der Agar durch Erhitzen auf dem Wasserbad gelöst, in Reagenzgläser abgefüllt (ca. 10 ccm), wiederum 15 Minuten bei 115 °C sterilisiert. Der Zweck der doppelten Sterilisation ist die Abtötung der eventuell vorhandenen Sporen, die durch die erste Sterilisation zur Keimung angeregt werden. Zum Erkalten werden die Röhrchen schräg gestellt.

Bebrütung der Dauerkultur: 24 Stunden bei 38 °C, dann Aufbewahren der Kulturen im Eisschrank bei 4 °C. Die Kulturen werden nach 4 Wochen erneuert.

Bereitung der Impflösung:

- 0,5 % Bacto-Pepton
- 0,1 % Difco-Hefeextrakt
- 1 % Na-Acetat
- 1 % Glucose

je 0,5 ccm der Salzlösungen A und B pro 100 ccm

Von dieser Nährlösung werden in Zentrifugengläser 8,5 ccm pipettiert und die Ansätze 15 Minuten bei 115 °C sterilisiert. Mit einer Platinöse wird von der Dauerkultur etwas Material in die Nährlösung überimpft, 18—20 Stunden bei 38 °C bebrütet und dann ca. 8 Minuten bei 3500 Touren zentrifugiert. Die Bakterien werden einmal mit steriler 0,9 % Kochsalzlösung ausgewaschen (d. h. in NaCl-Lösung suspendiert und erneut zentrifugiert) und zuletzt in 10 ccm NaCl-Lösung suspendiert.

Zusammensetzung der Nährlösung:

Glycocoll	320 mg
l-Alanin	3000 mg
l-Arginin. HCl	240 mg
l-Asparagin	1200 mg
l-Cystin	160 mg
l-Histidin. HCl. H ₂ O	40 mg
l-Glutaminsäure	400 mg
l-Oxyprolin	160 mg
dl-Isoleucin	240 mg
l-Leucin	160 mg
l-Lysin. HCl	240 mg
dl-Methionin	120 mg
dl-Norleucin	160 mg
dl-Phenylalanin	240 mg
l-Prolin	160 mg
dl-Serin	320 mg
dl-Threonin	800 mg
l-Tryptophan	40 mg
l-Tyrosin	80 mg
dl-Valin	240 mg
Glucose	40 g

Adenin	24 mg
Guanin	24 mg
Uracil	24 mg
Na-acetat	24 g
Ammoniumchlorid	12 g
Salzlösung A	10 ccm
Salzlösung B	10 ccm
B ₁	2 mg
B ₆	3,2 mg
Pantothensaures Ca	4 mg
B ₂	4 mg
Nicotinsäure	4 mg
Biotin	10 γ
Folsäure	4 γ
p-Aminobenzoesäure	0,2 γ
Wasser ad 1000 ccm, pH=6,8-7,0	

Zusammensetzung der Salzlösungen:

Salzlösung A: $\left. \begin{array}{l} 25 \text{ g KH}_2\text{PO}_4 \\ 25 \text{ g K}_2\text{HPO}_4 \end{array} \right\}$ in 250 ccm Wasser

Salzlösung B: $\left. \begin{array}{l} 10 \text{ g MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O} \\ 0,5 \text{ g NaCl} \\ 0,5 \text{ g FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O} \\ 0,5 \text{ g MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O} \end{array} \right\}$ in 250 ccm Wasser.
 Zugabe von 5 Tropfen conc. HCl, um Ausfallen von Salzen zu verhindern.

Die zu untersuchende Aminosäure, d. h. Tyrosin bzw. Leucin, wird aus der Nährlösung weggelassen. Für die Bestimmung von Leucin ist darauf zu achten, daß alle Substanzen leucinfrei sind. Es werden daher zur Leucinbestimmung folgende mehrmals *umkrystallisierte* Aminosäuren verwendet: Glutaminsäure, Histidin, Oxyprolin, Lysin und Phenylalanin.

Bereitung der Standardlösungen:

Von wässerigen Lösungen von l-Leucin und l-Tyrosin werden Verdünnungen hergestellt, die in je 2,5 ccm 1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 und 15,0 γ Substanz enthalten.

Bereitung der Harnansätze:

Der in 24 Stunden von weißen Ratten gesammelte Harn wird auf 50 bzw.

20 ccm mit doppeltdestilliertem Wasser verdünnt und filtriert. Zu diesem Zweck bringt man die Versuchstiere einzeln in Stoffwechselkäfige. Damit man möglichst allen Harn erhält, spült man den Käfig nach 24 Stunden sorgfältig aus. Die Versuchstiere erhalten während dieser Zeit keine Nahrung, damit keine Nahrungsreste in die Harnsammelschüssel gelangen können, die die Untersuchung beeinträchtigen könnten.

Bereitung der Ansätze aus Blutfiltrat:

Nachdem der Harn während einem oder mehreren Tagen gesammelt wurde, wird das Versuchstier getötet und das Blut in einem Becherglas aufgefangen. Die Blutgerinnung wird durch Na-citrat verhindert.

Ein Teil Blut wird mit 5 Teilen doppeltdest. Wasser verdünnt und mit einem Teil Na-Wolframat und einem Teil Schwefelsäure enteiweißt. Somit wird das Blut 8fach verdünnt. Das ausgefällte Eiweiß wird abzentrifugiert und das stark saure Blutserum (H_2SO_4) mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ alkalisch gemacht. Dabei fällt etwas BaSO_4 aus. Man zentrifugiert nochmals und neutralisiert dann die Blutflüssigkeit auf $\text{pH}=6,8-7,5$. Man mißt hierauf genau das Volumen und erhöht die Verdünnung auf das 10fache, indem man zum bisherigen Volumen $\frac{1}{4}$ doppeltdest. Wasser zugibt.

Bereitung der Versuchsansätze:

Zu je 2,5 ccm Nährlösung werden je 2,5 ccm der verschiedenen Standardlösungen zugegeben. Weitere Ansätze enthalten neben der Nährlösung 2,5 ccm des verdünnten Harnes bzw. des Blutfiltrates. Für jede Standardkonzentration bzw. jeden Harn und jedes Blutfiltrat werden Doppelansätze bereitet und bei der nachfolgenden Auswertung wird der Mittelwert verwendet.

Bebrütung der Ansätze:

Die Ansätze werden im Autoklaven bei 115°C während 15 Minuten sterilisiert. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur (mindestens aber auf 38°C) werden die Ansätze mit der oben beschriebenen Impflösung geimpft (pro Ansatz 1 Tropfen aus einer sterilen Rekordspritze oder einer zur Kapillare ausgezogenen sterilen Pipette). Danach werden die Ansätze 72 Stunden bei 38°C bebrütet.

Auswertung:

Die entstandene Milchsäure wird mit $n/10$ NaOH und Bromthymolblau als Indikator ($0,04\%$ in Alkohol) titriert. Da die Bakterien aus der Glucose eine genau dem zugesetzten Leucin bzw. Tyrosin entsprechende Menge

Milchsäure bilden, kann aus den Titrationswerten und den Standarddosen eine Standardkurve aufgezeichnet werden. Der Gehalt an Tyrosin bzw. Leucin kann dann aus der Standardkurve abgelesen werden.

Berechnung:

Durch Multiplikation der aus der Standardkurve abgelesenen Werte mit 20 (wenn der Tagesharn auf 50 ccm verdünnt wurde) oder mit 8 (wenn der Tagesharn auf 20 ccm verdünnt wurde) erhält man die Tyrosin- bzw. Leucinausscheidung im Tagesharn.

Die Werte für das Blut sind mit 400 zu multiplizieren. Man erhält dann den Aminosäuregehalt in 100 ccm Blut.

III. Erzeugung von Leberschäden durch Phosphorinjektion

Ein Teil weisser Phosphor wird in 100 Teilen Olivenöl aufgelöst und den Tieren subcutan injiziert. Die Tiere erhalten entweder eine einmalige Gabe von 1—5 mg oder mehrere Injektionen von 1—4 mg Phosphor.

IV. Leucin- und Tyrosinausscheidung normaler Ratten

Versuch Nr. 1: Tabelle 1

Tyrosin-Standard		Leucin-Standard	
γ Tyrosin / Ansatz	ccm n / 10 NaOH	γ Leucin / Ansatz	ccm n / 10 NaOH
0	0,64	0	0,85
1,25	0,8	1,25	1,08
2,5	1,06	2,5	1,38
5,0	1,49	5,0	1,8
7,5	2,13	7,5	2,2
10,0	2,38	10,0	2,5
15,0	2,85	15,0	3,38

Versuch Nr. 1: Tabelle 2

Tyrosinbestimmung: Harn auf 20 ccm verdünnt

Leucinbestimmung: Harn auf 50 ccm verdünnt

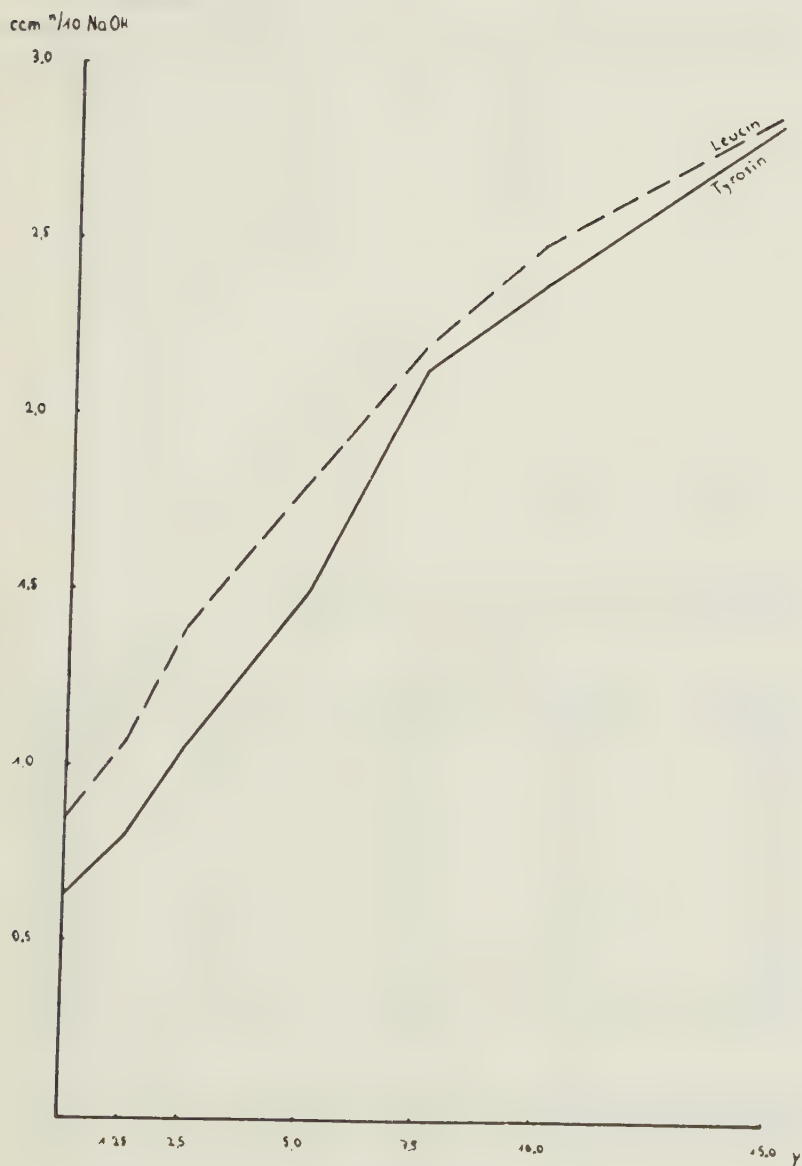
Versuchstiere Ratten Nr.	Tyrosinbestimmung		Leucinbestimmung	
	ccm n / 10 NaOH	γ Tyrosin im Tagesharn	ccm n / 10 NaOH	γ Leucin im Tagesharn
R 1	1,31	40,0	0,9	6,2
R 2	1,09	26,8	0,95	15,6
R 3	1,35	41,8	0,9	6,2
R 4	1,13	28,7	—	—
R 5	1,22	35,0	0,9	6,2
R 6	1,23	35,6	—	—
R 7	1,25	36,2	1,2	43,7
R 8	1,23	35,6	—	—
R 9	1,25	36,2	1,0	21,9
R 10	1,23	35,6	1,1	34,4

Durchschnittlicher Gehalt

35,2

21,1

Kurven zu Tab. 1



Versuch Nr. 2: Tabelle 3

Tyrosin-Standard		Leucin-Standard	
γ Tyrosin / Ansatz	ccm n / 10 NaOH	γ Leucin / Ansatz	ccm n / 10 NaOH
0	0,8	0	0,85
1,25	1,1	1,25	1,25
2,5	1,43	2,5	1,75
5,0	1,8	5,0	—
7,5	2,4	7,5	2,35
10,0	2,7	10,0	2,95
		15,0	3,15

Versuch Nr. 2: Tabelle 4

Tyrosinbestimmung: Harn auf 20 ccm verdünnt

Leucinbestimmung: Harn auf 20 ccm verdünnt

Versuchstiere Ratten Nr.	Tyrosinbestimmung		Leucinbestimmung	
	ccm n / 10 NaOH	γ Tyrosin im Tagesharn	ccm n / 10 NaOH	γ Leucin im Tagesharn
R 1	1,5	24,0	1,35	12,0
R 2	2,1	50,0	2,0	29,0
R 3	1,8	40,0	1,8	24,0
R 4	1,68	34,0	2,05	40,0
R 5	1,9	43,0	1,9	30,0
R 6	2,15	51,5	1,93	31,0
R 7	1,9	43,0	1,63	18,0)
R 8	1,2	13,0	1,18	8,0
R 9	1,83	41,0	1,78	22,0
R 10	1,2	13,0	1,13	7,0

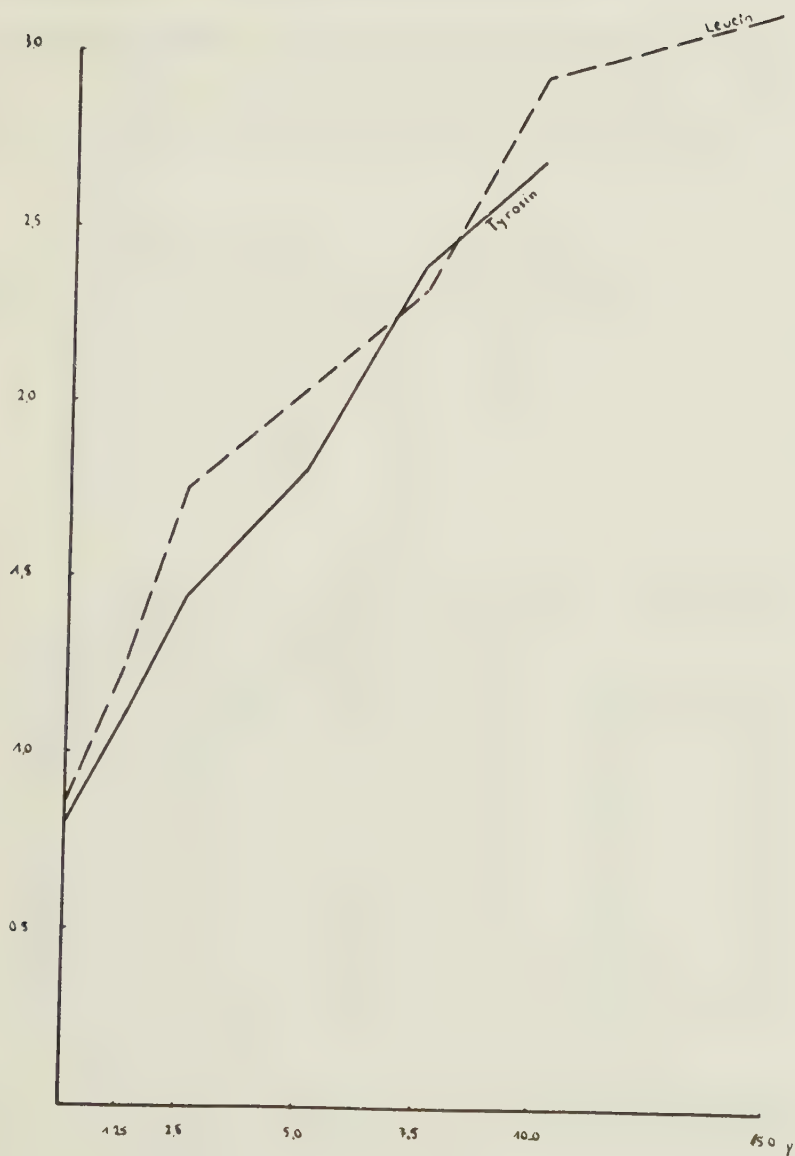
Durchschnittlicher Gehalt

35,2

22,0

Kurven zu Tab. 3

ccm $\frac{1}{10}$ NaOH



V. Leucin- und Tyrosinausscheidung nach einmaliger subcutaner Injektion von Phosphor

Nach der Injektion wurde der Tagesharn der 3—4 darauffolgenden Tage auf Leucin- und Tyrosingehalt geprüft.

Versuch Nr. 3: Tyrosin- und Leucinbestimmung im 1. Tagesharn nach Phosphorinjektion.

Tabelle 5

Tyrosin-Standard		Leucin-Standard	
γ Tyrosin / Ansatz	ccm n / 10 NaOH	γ Leucin / Ansatz	ccm n / 10 NaOH
0	0,8	0	0,7
1,25	1,13	1,25	1,2
2,5	1,35	2,5	1,4
5,0	1,83	5,0	1,73
7,5	2,5	7,5	2,23
10,0	2,9	10,0	2,58
15,0	3,75	15,0	3,45

Tabelle 6

Harn für Tyrosin- und Leucinbestimmung auf 20 ccm verdünnt

Versuchstiere Ratten Nr.	Phosphor- injektion	Tyrosinbestimmung		Leucinbestimmung	
		ccm n / 10 NaOH	γ Tyrosin im Tagesharn	ccm n / 10 NaOH	γ Leucin im Tagesharn
R 1	1 mg	1,13	10,0	1,03	6,0
R 2	1 mg	1,15	11,0	1,08	7,0
R 3	2 mg	1,15	11,0	1,0	5,0
R 4	2 mg	1,18	12,0	0,85	2,0
R 5	3 mg	1,1	9,0	0,9	3,0
R 6	3 mg	1,08	8,5	1,0	5,0
R 7	4 mg	1,93	43,0	1,25	12,0
R 8	4 mg	1,65	32,5	1,45	22,0
R 9	5 mg	2,0	45,0	1,5	26,0
R 10	5 mg	1,05	8,0	1,1	8,0

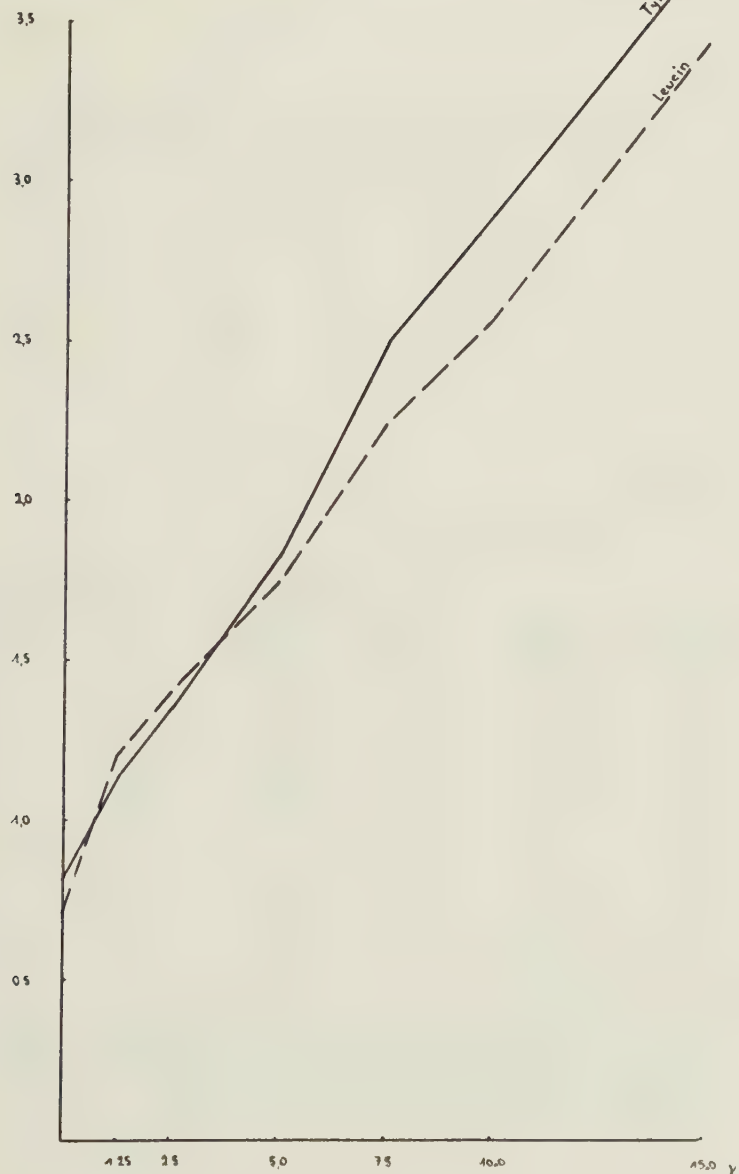
Durchschnittlicher Gehalt

18,9

9,6

Kurven zu Tab. 5

ccm $\frac{1}{40}$ NaOH



Versuch Nr. 4: Tyrosin- und Leucinbestimmung im 2. Tagesharn nach Phosphorinjektion.

Tabelle 7

Tyrosin-Standard		Leucin-Standard	
γ Tyrosin / Ansatz	ccm n / 10 NaOH	γ Leucin / Ansatz	ccm n / 10 NaOH
0	0,9	0	0,6
1,25	1,13	1,25	1,03
2,5	1,28	2,5	1,23
5,0	1,9	5,0	1,7
7,5	2,55	7,5	2,13
10,0	3,2	10,0	2,6
15,0	4,0	15,0	3,48

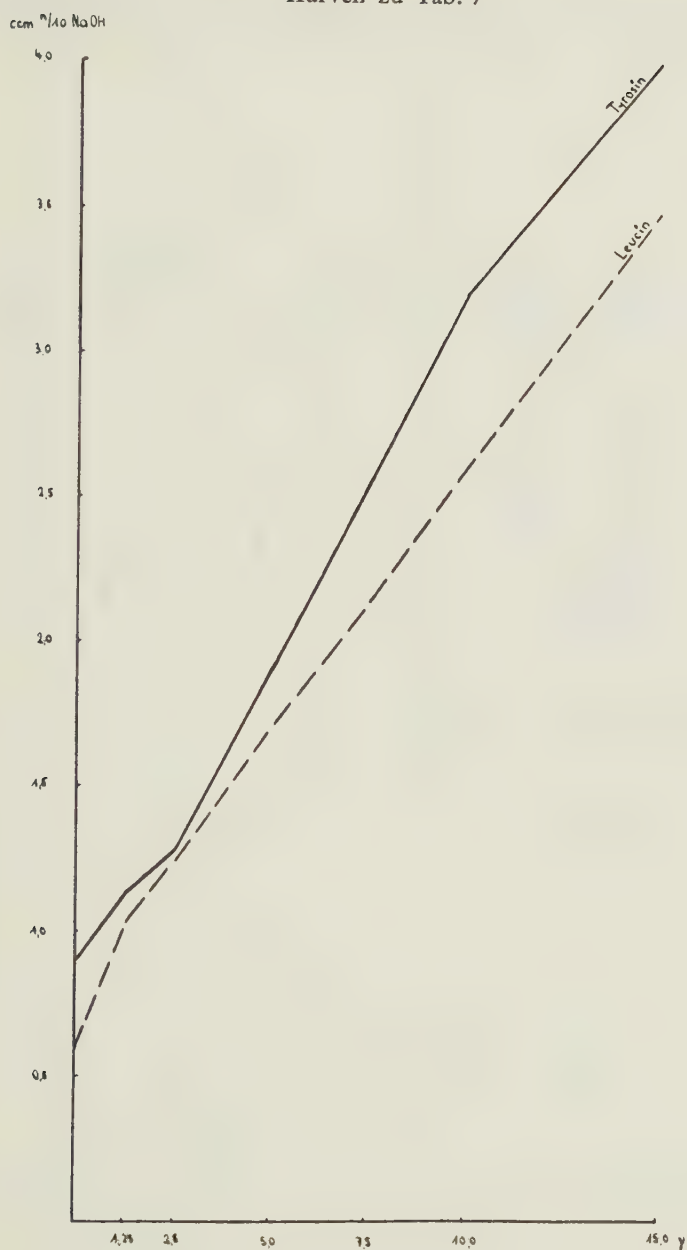
Tabelle 8

Harn für Tyrosin- und Leucinbestimmung auf 20 ccm verdünnt

Versuchstiere Ratten Nr.	Phosphor- injektion	Tyrosinbestimmung		Leucinbestimmung	
		ccm n / 10 NaOH	γ Tyrosin im Tagesharn	ccm n / 10 NaOH	γ Leucin im Tagesharn
R 1	1 mg	1,25	18,0	0,9	7,0
R 2	1 mg	1,75	35,0	1,48	30,0
R 3	2 mg	2,3	49,0	2,05	56,0
R 4	2 mg	1,4	24,0	1,1	13,0
R 5	3 mg	2,4	55,0	2,75	87,0
R 6	3 mg	1,9	40,0	2,0	55,0
R 7	4 mg*	—	—	—	—
R 8	4 mg	1,8	45,0	1,75	43,0
R 9	5 mg	1,5	26,0	1,9	50,0
R 10	5 mg	1,35	23,0	1,35	26,0
Durchschnittlicher Gehalt			35,0		40,7

* R 7 ist in der Nacht vom 2. auf den 3. Versuchstag eingegangen. R 1 und 2, die Ratten, welche 1 mg Phosphor erhielten, waren am 2. Versuchstag noch munter, während alle andern Tiere die Haare stellten und bewegungslos im Käfig sassen. Die Sektion bei allen Versuchstieren ergab eine Fettleber.

Kurven zu Tab. 7

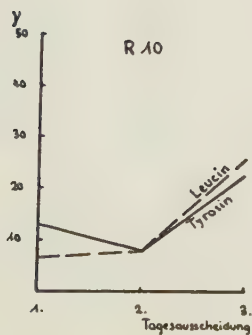
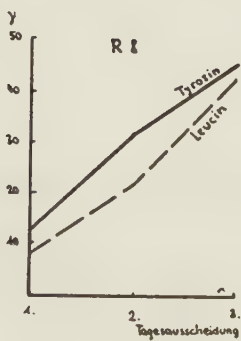
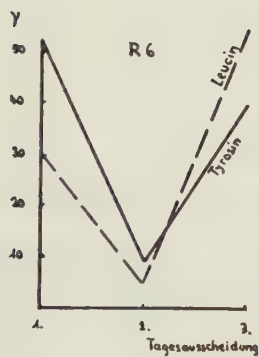
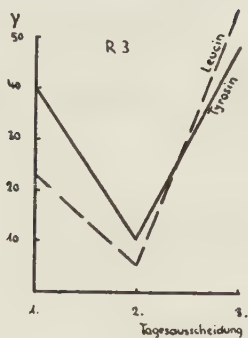
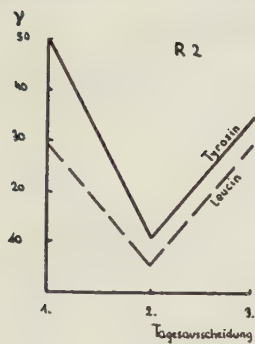


Zusammenstellung der Tyrosin- und Leucinausscheidung der einzelnen Ratten in den verschiedenen Tagesausscheidungen vor und nach einer einmaligen Phosphorinjektion.

Tabelle 9

Versuchs- tiere Ratten Nr.	Phosphor- injektion	Tyrosingehalt in γ			Leucingehalt in γ		
		vor P- Injekt	im 1. T'Harn nach P	im 2. T'Harn nach P	vor P- Injekt	im 1. T'Harn nach P	im 2. T'Harn nach P
R 1	1 mg	24	10	18	12	6	7
R 2	1 mg	50	11	35	29	7	30
R 3	2 mg	40	11	49	24	5	56
R 4	2 mg	34	12	24	40	2	13
R 5	3 mg	43	9	55	30	3	87
R 6	3 mg	51,5	8,5	40	31	5	55
R 7	4 mg	43	43	—	18	12	—
R 8	4 mg	13	32	45	8	22	43
R 9	5 mg	41	45	26	22	26	50
R 10	5 mg	13	8	23	7	8	26
Durchschnittlicher Gehalt		35,2	18,9	35	22	9,6	40,7

Kurven zu Tab. 9



VI. Leucin- und Tyrosinausscheidung nach wiederholter subcutaner Phosphorinjektion

Versuch Nr. 5; Tyrosin- und Leucinbestimmung im Tagesharn nach der 1. Phosphorinjektion.

Tabelle 10

Tyrosin-Standard		Leucin-Standard	
γ Tyrosin / Ansatz	ccm n / 10 NaOH	γ Leucin / Ansatz	ccm n / 10 NaOH
0	1,05	0	0,83
1,25	1,3	1,25	1,2
2,5	1,5	2,5	1,5
5,0	2,25	5,0	1,83
7,5	2,53	7,5	2,0
10,0	3,13	10,0	2,78
15,0	3,9	15,0	3,65

Tabelle 11

Harn für Tyrosin- und Leucinbestimmung auf 20 ccm verdünnt

Versuchstiere Ratten Nr.	Phosphor- injektion	Tyrosinbestimmung		Leucinbestimmung	
		ccm n / 10 NaOH	γ Tyrosin im Tagesharn	ccm n / 10 NaOH	γ Leucin im Tagesharn
R 1	1 mg	1,95	32,0	1,75	34,0
R 2	1 mg	1,75	27,0	1,5	20,0
R 3	1 mg	2,2	37,6	1,78	36,0
R 4	1 mg	1,75	27,0	1,5	20,0
R 5	1 mg	2,1	36,0	2,05	60,8
R 6	2 mg	1,95	32,0	1,75	34,0
R 7	2 mg	1,8	28,0	1,75	34,0
R 8	2 mg	1,4	15,5	1,7	32,0
R 9	2 mg	1,55	21,5	1,4	17,0
R 10	2 mg	1,78	27,5	1,63	29,0

Durchschnittlicher Gehalt

28,3

31,7

Kurven zu Tab. 10



Versuch Nr. 6: Tyrosin- und Leucinbestimmung im Tagesharn nach der
2. Phosphorinjektion.

Tabelle 12

Tyrosin-Standard		Leucin-Standard	
γ Tyrosin / Ansatz	ccm n / 10 NaOH	γ Leucin / Ansatz	ccm n / 10 NaOH
0	0,58	0	0,4
1,25	0,9	1,25	0,85
2,5	1,03	2,5	1,03
5,0	1,6	5,0	1,75
7,5	2,1	7,5	2,08
10,0	2,78	10,0	2,5
15,0	3,5	15,0	3,35

Tabelle 13

Harn für Tyrosin- und Leucinbestimmung auf 20 ccm verdünnt

Versuchstiere Ratten Nr.	Phosphor- injektion	Tyrosinbestimmung		Leucinbestimmung	
		ccm n / 10 NaOH	γ Tyrosin im Tagesharn	ccm n / 10 NaOH	γ Leucin im Tagesharn
R 1	2 mg	1,45	35,0	1,33	27,0
R 2	2 mg	1,7	44,0	1,75	40,0
R 3	2 mg	2,2	63,0	2,0	50,0
R 4	2 mg	1,28	28,5	1,58	35,0
R 5	2 mg	1,23	27,0	0,95	15,0
R 6	4 mg	2,25	64,5	2,8	94,0
R 7	4 mg	2,05	58,5	2,35	72,0
R 8	4 mg	1,85	50,0	2,1	60,8
R 9	4 mg	1,65	42,0	1,9	49,0
R 10	4 mg	1,35	31,0	1,35	29,0

Durchschnittlicher Gehalt

44,3

47,2

Kurven zu Tab. 12

ccm η_{10} NaOH



Versuch Nr. 7: Tyrosin- und Leucinbestimmung im Tagesharn nach der
3. Phosphorinjektion.

Tabelle 14

Tyrosin-Standard		Leucin-Standard	
y Tyrosin / Ansatz	ccm n / 10 NaOH	y Leucin / Ansatz	ccm n / 10 NaOH
0	0,7	0	0,6
1,25	0,95	1,25	0,9
2,5	1,2	2,5	1,3
5,0	1,78	5,0	1,65
7,5	2,4	7,5	2,18
10,0	2,75	10,0	2,53
15,0	3,55	15,0	3,43

Tabelle 15

Harn für Tyrosin- und Leucinbestimmung auf 20 ccm verdünnt

Versuchstiere Ratten Nr.	Phosphor- injektion	Tyrosinbestimmung		Leucinbestimmung	
		ccm n / 10 NaOH	y Tyrosin im Tagesharn	ccm n / 10 NaOH	y Leucin im Tagesharn
R 1	3 mg	2,68	76,0	3,38	117,0
R 2	3 mg	1,73	38,0	1,7	41,0
R 3	3 mg	2,4	60,0	2,5	77,0
R 4	3 mg	1,88	43,0	1,95	50,0
R 5	3 mg	1,25	22,0	1,2	18,0
R 6	6 mg	1,4	27,0	2,15	58,0
R 7	6 mg	3,43	114,0	2,73	89,0
R 8	6 mg	3,25	105,0	4,23	182,0
R 9	6 mg	1,93	45,0	2,05	52,0
R 10	6 mg	2,25	55,0	2,83	92,0

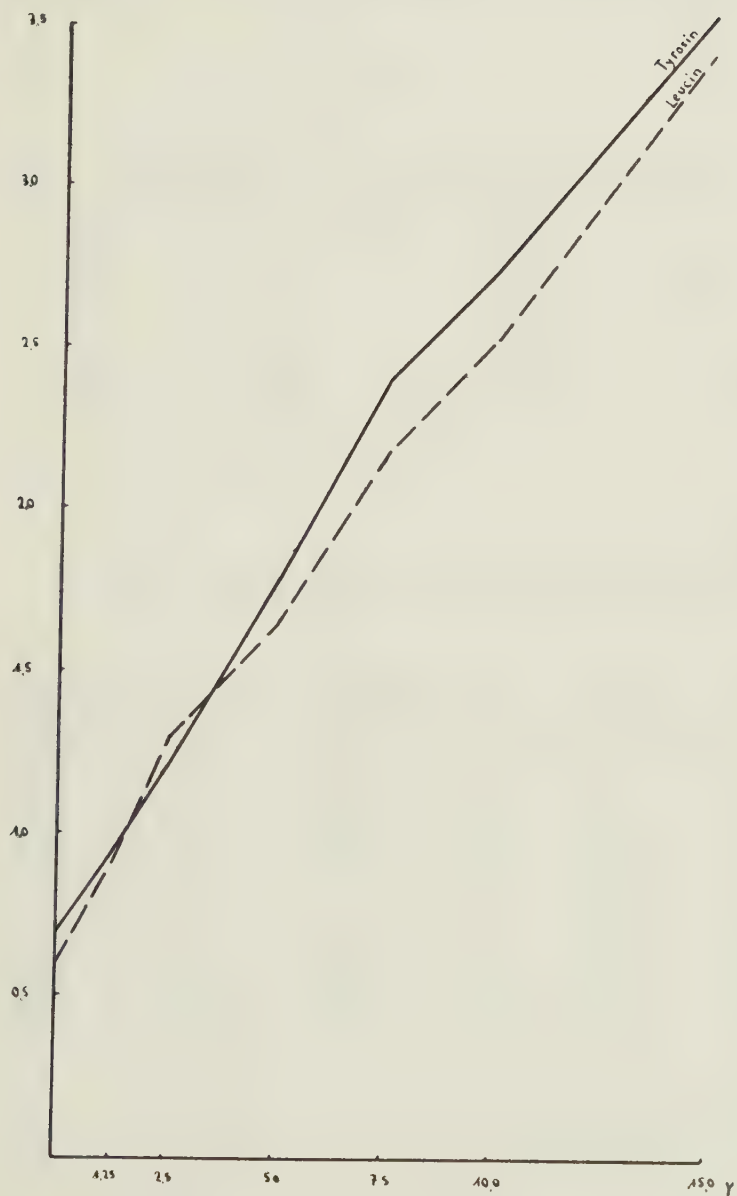
Durchschnittlicher Gehalt

58,5

77,6

Kurven zu Tab. 14

cem η_{40} NaOH



Versuch Nr. 8: Tyrosin- und Leucinbestimmung im Tagesharn nach der
4. Phosphorinjektion.

Tabelle 16

Tyrosin-Standard		Leucin-Standard	
γ Tyrosin / Ansatz	ccm n / 10 NaOH	γ Leucin / Ansatz	ccm n / 10 NaOH
0	0,55	0	0,55
1,25	0,95	1,25	0,9
2,5	1,2	2,5	1,08
5,0	1,65	5,0	1,53
7,5	2,08	7,5	1,9
10,0	2,5	10,0	2,2
15,0	3,2	15,0	2,8

Tabelle 17

Harn für Tyrosin- und Leucinbestimmung auf 20 ccm verdünnt

Versuchstiere Ratten Nr.	Phosphor- injektion	Tyrosinbestimmung		Leucinbestimmung	
		ccm n / 10 NaOH	γ Tyrosin im Tagesharn	ccm n / 10 NaOH	γ Leucin im Tagesharn
R 1	4 mg	1,65	40,0	1,65	47,0
R 2	4 mg	1,85	49,6	2,0	67,0
R 3	4 mg	1,53	35,0	1,45	37,0
R 4	4 mg	1,78	46,0	1,7	50,0
R 5	4 mg	1,03	13,2	1,05	19,6
R 6	6 mg	—	—	—	—
R 7	6 mg	1,4	29,0	1,5	38,0
R 8	6 mg	1,9	50,0	1,53	40,0
R 9	8 mg	0,73	5,0	0,95	14,0
R 10	8 mg	0,75	5,0	0,93	14,0

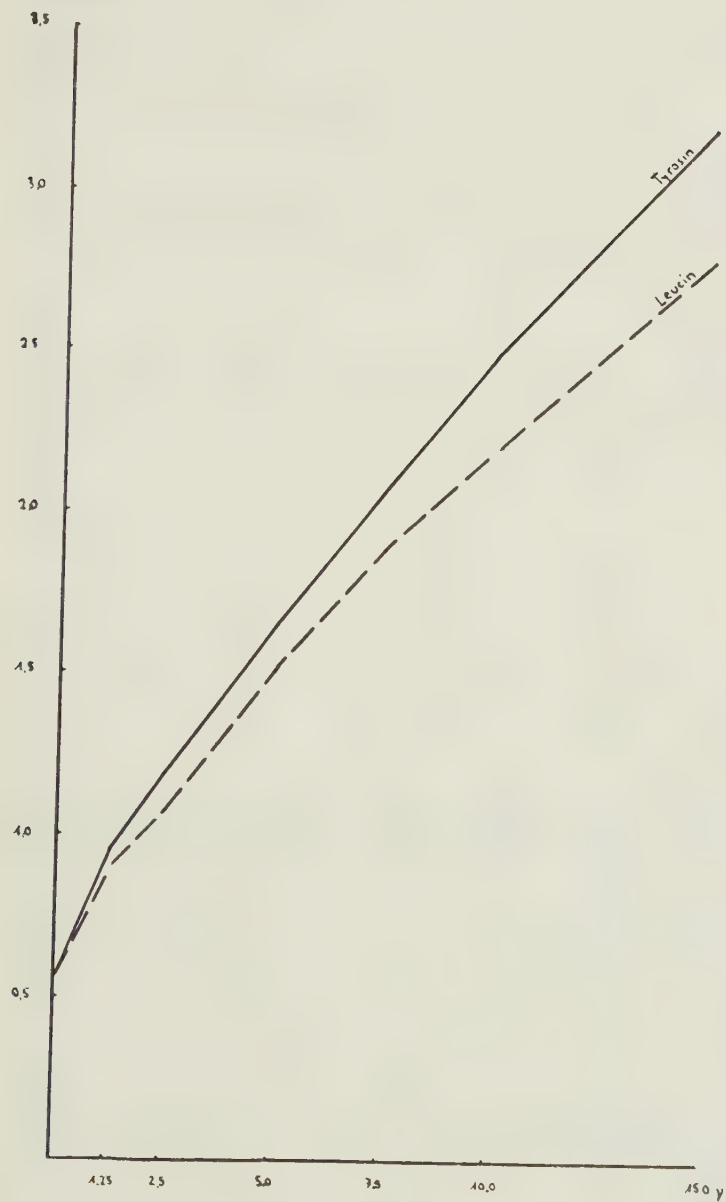
Durchschnittlicher Gehalt

30,3

32,8

Kurven zu Tab. 16

cm²/40 NaOH



Nach der 1. Phosphorspritze, d. h. am 2. Versuchstag waren alle Tiere äußerlich normal. Am 3. Versuchstag waren die Tiere mit 2 mg Phosphor noch munter, während diejenigen mit 4 mg sich viel ruhiger verhielten und begannen die Haare zu stellen. Am 4. Versuchstag zeigten die Tiere mit 6 mg deutliche Erscheinungen des Ablebens, R 6 mußte getötet werden. Am 5. Versuchstag wurden alle Tiere getötet. Der Zustand von R 9 und R 10 war so schlecht, daß die Tiere auf nichts mehr reagierten; sie gaben auch nur ca. 1,5 ccm Blut. Der Sektionsbefund aller Tiere ergab wiederum eine sehr starke Verfettung der Leber.

Zusammenstellung der Tyrosin- und Leucinausscheidung der einzelnen Ratten in den verschiedenen Tagesausscheidungen nach 4 aufeinanderfolgenden Phosphorinjektionen.

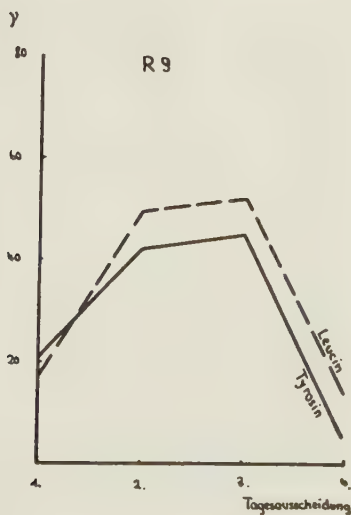
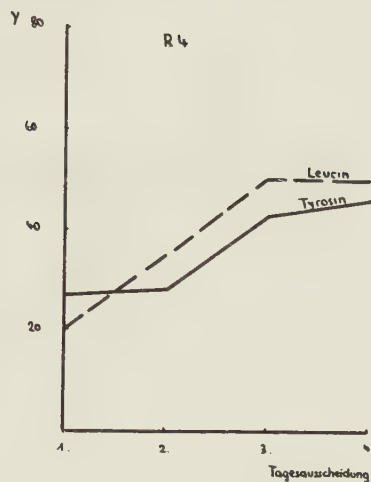
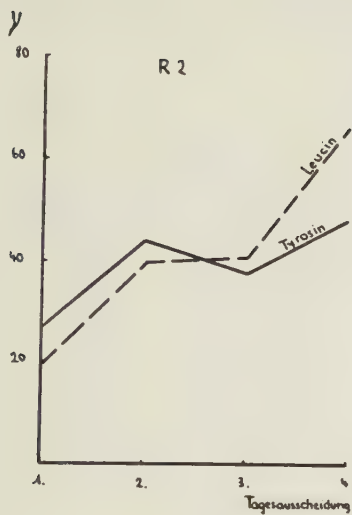
Tabelle 18a

	Phosphor in mg	Tyrosin nach 1. Injekt.	Phosphor in mg	Tyrosin nach 2. Injekt.	Phosphor in mg	Tyrosin nach 3. Injekt.	Phosphor in mg	Tyrosin nach 4. Injekt.
R 1	1	32 _y	2	35 _y	3	76 _y	4	40 _y
R 2	1	27	2	44	3	38	4	49,6
R 3	1	37,6	2	63	3	60	4	35
R 4	1	27	2	28	3	43	4	46
R 5	1	36	2	27	3	22	4	13,2
R 6	2	32	4	64,5	6	27	6	—
R 7	2	28	4	58,5	6	114	6	29
R 8	2	15,5	4	50	6	105	6	50
R 9	2	21,5	4	42	6	45	8	5
R 10	2	27, 5	4	31	6	55	8	5
Durchschnitt		28,3 _y		44,3 _y		58,5 _y		30,3 _y

Tabelle 18b

	Phosphor in mg	Leucin nach 1. Injekt.	Phosphor in mg	Leucin nach 2. Injekt.	Phosphor in mg	Leucin nach 3. Injekt.	Phosphor in mg	Leucin nach 4. Injekt.
R 1	1	34 _y	2	27 _y	3	117 _y	4	47 _y
R 2	1	20	2	40	3	41	4	67
R 3	1	36	2	50	3	77	4	37
R 4	1	20	2	35	3	50	4	50
R 5	1	60,8	2	15	3	18	4	19,6
R 6	2	34	4	94	6	58	6	—
R 7	2	34	4	72	6	89	6	38
R 8	2	32	4	60,8	6	182	6	40
R 9	2	17	4	49	6	52	8	14
R 10	2	29	4	29	6	92	8	14
Durchschnitt		31,7 _y		47,2 _y		77,6 _y		32,8 _y

Kurven zu Tab. 18



VII. Leucin- und Tyrosingehalt im Serum normaler Ratten

Versuch Nr. 9;

Tabelle 19

Tyrosin-Standard		Leucin-Standard	
y Tyrosin / Ansatz	ccm n / 10 NaOH	y Leucin / Ansatz	ccm n / 10 NaOH
0	0,88	0	0,88
1,25	0,95	1,25	1,0
2,5	1,22	2,5	1,33
5,0	1,83	5,0	1,85
7,5	2,35	7,5	2,38
10,0	2,7	10,0	2,83
15,0	3,5	15,0	3,5

Tabelle 20

Blut auf das 10fache Volumen verdünnt

Versuchstiere Ratten Nr.	Tyrosinbestimmung		Leucinbestimmung	
	ccm n / 10 NaOH	Leucingehalt im Blut in mg %	ccm n / 10 NaOH	Leucingehalt im Blut in mg %
R 1	1,3	1,13	1,62	1,5
R 2	1,0	0,6	1,28	0,9
R 3	1,14	0,85	1,2	0,8
R 4	1,1	0,74	1,35	1,02
R 5	1,1	0,74	1,32	1,0
R 6	1,27	1,07	1,43	1,1
R 7	1,15	0,85	1,32	1,0
R 8	1,15	0,85	1,3	0,95
R 9	1,23	1,0	1,34	1,0
R 10	1,43	1,3	1,43	1,1

Durchschnittlicher Gehalt 0,9 1,03

Kurven zu Tab. 19

ccm $\pi/40$ NaOH



VIII. Leucin- und Tyrosingehalt im Rattenserum nach Phosphorinjektion

Versuch Nr. 10: Tyrosin- und Leucinbestimmung im Blut nach einmaliger Phosphorinjektion.

Tabelle 21

Tyrosin-Standard		Leucin-Standard	
γ Tyrosin / Ansatz	ccm n / 10 NaOH	γ Leucin / Ansatz	ccm n / 10 NaOH
0	0,8	0	0,6
1,25	1,0	1,25	1,1
2,5	1,3	2,5	1,3
5,0	1,85	5,0	1,6
7,5	2,3	7,5	2,1
10,0	2,85	10,0	2,5
15,0	3,7	15,0	3,35

Tabelle 22

Blut auf das 10fache Volumen verdünnt

Versuchstiere Ratten Nr.	Phosphor- injektion	Tyrosinbestimmung		Leucinbestimmung	
		ccm n / 10 NaOH	Tyrosin im Blut in mg $\%$	ccm n / 10 NaOH	Leucin im Blut in mg $\%$
R 1	1 mg	1,2	0,85	1,5	1,7
R 2	1 mg	1,35	1,07	1,3	1,0
R 3	2 mg	1,65	1,63	1,6	2,0
R 4	2 mg	1,5	1,38	1,7	2,25
R 5	3 mg	1,6	1,52	2,05	2,9
R 6	3 mg	1,45	1,28	1,45	1,4
R 7	4 mg*	—	—	—	—
R 8	4 mg	1,2	0,85	1,6	2,0
R 9	5 mg	1,5	1,38	1,85	2,5
R 10	5 mg	1,5	1,38	2,05	2,9

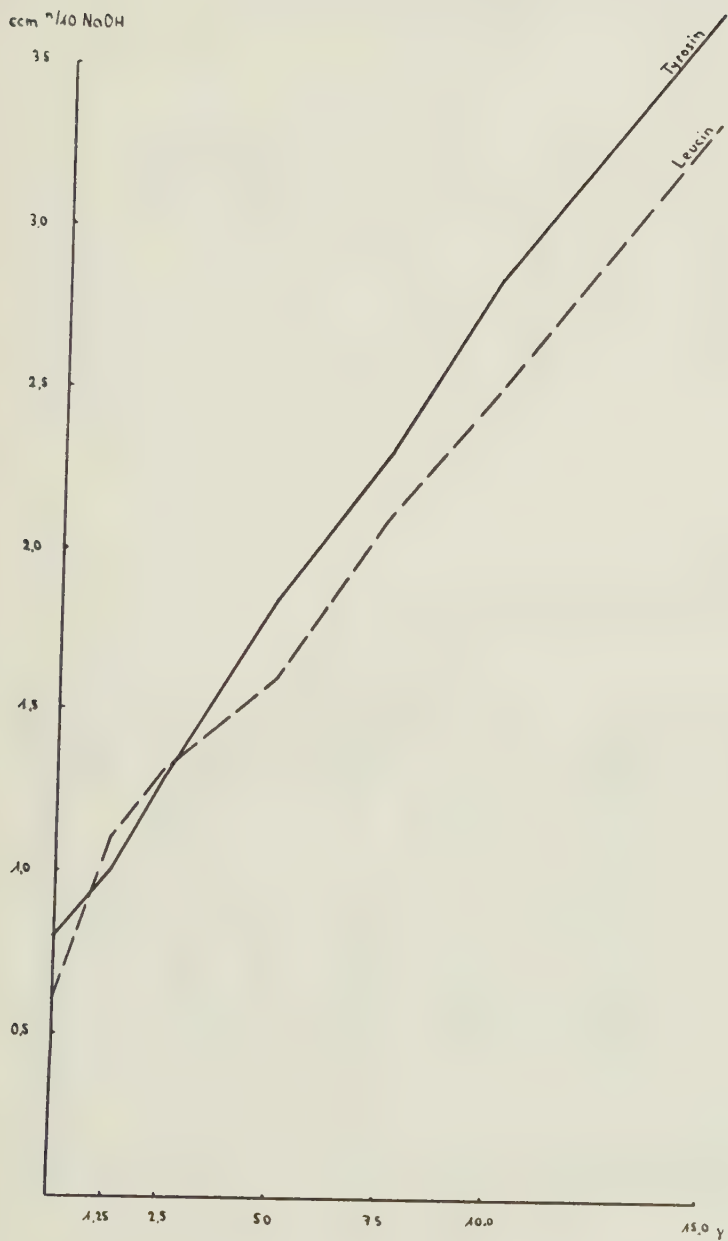
Durchschnittlicher Gehalt

1,26

2,07

* vgl. Seite 13

Kurven zu Tab. 21



Versuch Nr. 11: Tyrosin- und Leucinbestimmung im Blut nach 4 aufeinandergefolgten Phosphorinjektionen.

Tabelle 23

Tyrosin-Standard		Leucin-Standard	
γ Tyrosin / Ansatz	ccm n / 10 NaOH	γ Leucin / Ansatz	ccm n / 10 NaOH
0	0,7	0	0,55
1,25	0,9	1,25	0,85
2,5	1,1	2,5	1,05
5,0	1,53	5,0	1,5
7,5	1,95	7,5	1,95
10,0	2,3	10,0	2,25
15,0	3,25	15,0	2,85

Tabelle 24

Blut auf das 10fache Volumen verdünnt

Versuchstiere Ratten Nr.	Phosphor- injektion	Tyrosinbestimmung		Leucinbestimmung	
		ccm n / 10 NaOH	Tyrosin im Blut in mg $\%$	ccm n / 10 NaOH	Leucin im Blut in mg $\%$
R 1	4 mg	2,15	3,6	1,4	1,85
R 2	4 mg	1,23	1,5	1,05	1,1
R 3	4 mg	1,1	1,0	1,03	1,0
R 4	4 mg	1,15	1,13	1,13	1,25
R 5	4 mg	1,4	1,7	1,8	2,7
R 6	6 mg	1,15	1,13	1,85	2,85
R 7	6 mg	1,1	1,0	1,25	1,5
R 8	6 mg	1,35	1,6	2,4	4,45
R 9	8 mg	1,3	1,47	2,1	3,5
R 10	8 mg	1,08	0,95	1,08	1,05

Durchschnittlicher Gehalt

1,5

2,12

Kurven zu Tab. 23

ccm $\frac{1}{10}$ NaOH



Diskussion der Ergebnisse

Die Versuche Nr. 1 und 2 zeigen, daß sich das Tyrosin und das Leucin im normalen Rattenharn mit der mikrobiologischen Methode eindeutig quantitativ bestimmen lassen. Die durchschnittlich im Tagesharn ausgeschiedene Tyrosinmenge beträgt 35 μ , die Leucinmenge 21,5 μ .

In den Versuchen 3 und 4 beobachten wir, daß direkt nach einer einmaligen Phosphorinjektion das Tyrosin und das Leucin stark vermindert auftreten. Im 2. Tagesharn erfolgt bereits wieder ein Ansteigen der Tyrosinausscheidung. Sie übertrifft aber nur in 4 Fällen (R 3, R 5, R 8 und R 10) den Normalwert. Der Leucinanstieg im 2. Tagesharn nach Phosphorvergiftung verläuft viel steiler: während in der 1. Tagesausscheidung nur R 8 und R 9 die normalen Leucinwerte erreichen, übertreffen in der 2. Tagesausscheidung mit Ausnahme von R 1 und R 4 alle andern Tiere die normal ausgeschiedenen Mengen (R 5 sogar um das 4fache).

In den Versuchen 5, 6, 7 und 8, in welchen den Versuchstieren täglich Phosphor injiziert wurde, stellen wir fest, daß die Tyrosinausscheidung von einem unter dem Normalwert liegenden Punkt aus ansteigt bis zu einem Maximum und dann wieder in die Grenzen des Normalwertes oder sogar darunter absinkt. Die Leucinsekretion verläuft ähnlich derjenigen des Tyrosins. Das bestätigt uns wiederum, daß nach Phosphorvergiftung viel mehr Leucin ausgeschieden wird als Tyrosin. Im Hinblick auf die Tatsache, daß auch im Lebereiweiß Leucin in erheblich größerer Menge vorliegt als Tyrosin, weist das Ausscheidungsverhältnis dieser beiden Aminosäuren darauf hin, daß die Phosphorvergiftung einen Abbau des Lebereiweißes zur Folge hat.

Aus Versuch 9 geht hervor, daß die Tyrosinkonzentration im normalen Blut mit 0,9 mg % gegenüber derjenigen von Leucin mit 1,03 mg % nicht wesentlich verschieden ist. Vergleichen wir die Mengenverhältnisse der beiden Aminosäuren im normalen Harn und Blut, so sehen wir, daß das Tyrosin und das Leucin in den beiden Körperflüssigkeiten ungefähr in den gleichen Konzentrationen vorhanden sind. Die tägliche Harnausscheidung einer ausgewachsenen weißen Ratte beträgt 2,8—3,5 ccm. Danach würden im ccm Harn ungefähr 10 μ Tyrosin und 7 μ Leucin ausgeschieden, während in unsern Untersuchungen im ccm Blut ca. 9 μ Tyrosin und 10 μ Leucin gefunden wurden.

Das nach Phosphorvergiftung untersuchte Blut (Versuche 10 und 11) ergibt eine starke Mobilisierung von Torsin und ganz speziell von Leucin (von 1,03 mg % auf 2,07 mg %). Vergleichen wir die Mengenverhältnisse im Blut und im Harn nach Phosphorinjektion, so ergibt sich wiederum, daß sie einander entsprechen und daß parallel dem Konzentrationsanstieg im Blut ein solcher im Harn erfolgt.

Zusammenfassung

1. Der durchschnittliche Tyrosingehalt im normalen Harn von ausgewachsenen, weißen, weiblichen Ratten beträgt ca. 35 γ , der Leucingehalt ca. 22 γ .
2. Der durchschnittliche Tyrosingehalt im normalen Blutserum beträgt 0,9 mg %, der Leucingehalt 1,03 mg %.
3. Die Tyrosin- und Leucinkonzentration im normalen Harn entspricht annähernd derjenigen des Blutes.
4. Direkt nach einmaliger Phosphorinjektion sinkt der Tyrosingehalt im Harn. Im 2. Tagesharn steigt er wieder an und übertrifft in den meisten Fällen den Normalwert.

In entsprechender Weise ist der Leucingehalt direkt nach der Phosphorvergiftung im Harn vermindert. Gegenüber der Tyrosinausscheidung steigt die Leucinausscheidung jedoch im 2. Tagesharn nach der Phosphorvergiftung viel stärker an.

5. Bei wiederholten Phosphorinjektionen ist anfänglich auch ein Absinken der Leucin- und Tyrosinausscheidung im Harn zu beobachten. Am 2. und 3. Tag erfolgt eine starke Vermehrung der Ausscheidung, die ein Mehrfaches des Normalwertes betragen kann. Die Leucinausscheidung ist beträchtlich größer als die Tyrosinausscheidung.

Literaturangaben.

- 1) *Abderhalden E. und Bergell P.*: Z. physiol. Ch. 39, 464 (1903)
- 2) *Abderhalden E. und Backer L. F.*: Z. physiol. Ch. 42, 524 (1909)
- 3) *Abderhalden E. und Schittenhelm*: Z. physiol. Ch. 45, 468 (1905)
- 4) *Samuely F. und Forssner*: Z. physiol. Ch. 47, 15, 376 (1906)
- 5) *Fischer und Stroller H.*: Pharmaz. Ztg. 81, 38—39 8./1. (1936)
- 6) *Risak Erwin*: Med. Klinik 26, 666—68 2./5. (1930)
- 7) *Humber*: Handb. der Biochem. VIII, 861
- 8) *Bang J.*: Biochem. Z. 72, 166 (1916)
- 9) *Fränkel A.*: Berl. klin. Ws. 1878, Nr. 19
- 10) *Feigel J. und Luce H.*: Biochem. Z. 79, 162, 207 (1917); 86, 48 (1918); 94, 84 (1919)
- 11) *Araki T.*: Z. physiol. Ch. 17, 311 (1893)
- 12) *Schumm O. und Papendick*: Z. physiol. Ch. 121, 1 (1922)
- 13) *Goebel F.*: Giorn. di clin. med. 3, 41—48 Siena, Univ.
- 14) *Falk F. und Saxel P.*: Z. Klin. Med. 73, 325 (1911)
- 15) *Frey W.*: Z. Klin. Med. 72, 383 (1911)
- 16) *Labbé M. und Nith H.*: Bull. mem. soc. med. hôp. Paris Nr. 32, 510 (1913)
- 17) *Taylor A. E.*: Z. physiol. Ch. 34, 580 (1902)
- 18) *Abderhalden E.*: Z. physiol. Ch. 114, 250 (1921)
- 19) *Hier S. W.*: J. Biol. Chem. 171, 813 (1947)
Wiß O.: Helv. 31, 2148 (1948); 32, 153 (1949)
Hatz F.: Helv. 32, 251 (1949)
- 20) *Dunn M. S., Caminn M. N., Shankman S. und Bloch H.*: Arch. Biochem. 13, 207 (1947)
Thompson R. C. und Kirby H. R.: Arch. Biochem. 21, 210 (1949)
Woodson H. W., Hier S. W., Salomon J. D. und Bergheim O.: J. Biol. Chem. 172, 613 (1948)
Sauberlich H. E. und Baumann C. A.: J. Biol. Chem. 175, 29 (1948)
Sauberlich H. E., Pearce E. L. und Bauman C. A.: J. Biol. Chem. 175, 29 (1948)
Hegsted D. M.: J. Biol. Chem. 157, 741 (1945)
Frankel W. und Dunn M. S.: Arch. Biochem. 13, 93 (1947)
Vest M. und Wiß O.: Helv. 33, 422 (1950)
- 21) *Dunn M. S., Shankman S., Camien M. N., Frankel W. und Rocklana L. B.*: J. Biol. Chem. 156, 703 (1945)

Curriculum vitae

Geboren 6. November 1924 in Baar (Kt. Zug) 6 Jahre Primarschule in Seewen-Schwyz 2 Jahre Sekundarschule in Schwyz 6 Jahre Gymnasium in Schwyz 5 Jahre zahnärztliches Studium in Fribourg, Basel und Zürich Zahnärztliche Fachprüfung in Zürich, Herbst 1950

